



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101802168 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 200880107196.7

C12R 1/465(2006.01)

(22) 申请日 2008.09.12

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

W0 2006111561 A1, 2006.10.26, 全文.

239001/07 2007.09.14 JP

Madduri, K.. production of the antitumor durg epitubicin (4 -epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of Streptomyces peucetius. 《Nature Biotechnology》.1998, 第16卷69-74.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/066596 2008.09.12

Chen Huawei. Deoxycugars in glycopeptide antibiotics: Enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis. 《Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America》.2000, 第97卷(第22期), 11942-11947.

(87) PCT申请的公布数据

W02009/035107 JA 2009.03.19

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10898 2007.08.14

(73) 专利权人 明治制果株式会社

地址 日本东京都

审查员 杨光

(72) 发明人 隅田奈绪美 渡边学 矢内耕二

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

C12P 19/56(2006.01)

C07H 15/252(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表26页

(54) 发明名称

非天然型抗生素的制造方法

(57) 摘要

本申请公开了在天然具有生产柔红霉素的能力的放线菌中导入与L-表万古胺的生物合成相关的酮还原酶基因而得到的转化体、以及利用其有效生产非天然型柔红霉素衍生物的方法。本转化体具有有效生产表柔红霉素等非天然型柔红霉素衍生物的能力。

1. 在天然具有生产柔红霉素的能力的放线菌中导入与 L- 表万古胺的生物合成相关的酮还原酶基因而得到的转化体, 其中

与 L- 表万古胺的生物合成相关的酮还原酶基因是:

编码由 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列组成的蛋白质的基因,

由下述 DNA 组成的基因, 所述 DNA 由 SEQ ID NO:2 所表示的碱基序列组成, 或

由下述 DNA 组成的基因, 所述 DNA 由 SEQ ID NO:28 所表示的碱基序列组成;

所述宿主放线菌为天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*)。

2. 权利要求 1 所述的转化体, 其生产表柔红霉素作为柔红霉素衍生物。

3. 柔红霉素衍生物的制造方法, 该制造方法包括下述步骤:

培养权利要求 1 或 2 所述的转化体、并从培养液收集柔红霉素衍生物。

非天然型抗生素的制造方法

技术领域

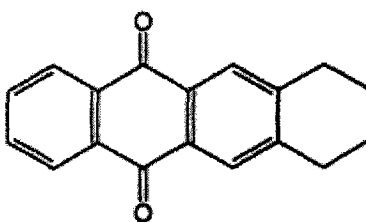
[0001] 本发明涉及利用微生物对半合成生产的柔红霉素衍生物进行发酵生产的方法。

背景技术

[0002] 蒽环类抗生素是一类芳香族聚酮化合物,其是由以 7,8,9,10-四氢-5,12-萘并萘醌(下图)为基本骨架的糖苷配基部分和以氨基糖为主体的糖类构成的色素糖苷(glycoside)。

[0003] [化学式 1]

[0004]

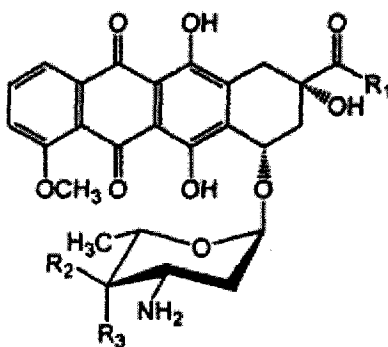


[0005] 蒽环类抗生素与 DNA 结合,产生自由基从而切断 DNA 链,或者抑制拓扑异构酶 II。拓扑异构酶具有 DNA 酶和连接酶活性,其催化 DNA 链的暂时切断与再次结合,而蒽环类抗生素通过抑制拓扑异构酶 II 来阻碍 DNA 复制,发挥抗肿瘤活性。蒽环类抗生素虽然已确认具有蓄积性心脏毒作用,但其对广范围的癌细胞显示抗肿瘤活性,因此,一直将其作为有用的抗癌剂。

[0006] 目前使用的主要蒽环类抗癌剂中包括:发酵产物来源的柔红霉素,以及多柔比星、表柔比星这样的以柔红霉素为原料的半合成成品。

[0007] [化学式 2]

[0008]



[0009] [表 1]

[0010]

	R ₁	R ₂	R ₃
柔红霉素	CH ₃	H	OH

多柔比星	CH ₂ OH	H	OH
表柔红霉素	CH ₃	OH	H
表柔比星	CH ₂ OH	OH	H

[0011] 从抗肿瘤活性与毒性层面来看,表柔比星优于柔红霉素、多柔比星,但是,用于将氨基糖部分的4位羟基反转的化学合成步骤的收率低,现状是虽然可以以柔红霉素作为初始原料来生产表柔比星,但制造成本方面存在许多问题。另一方面,有报告称进行了下述研究:通过将编码与柔红霉素生物合成相关的酮还原酶产物立体特异性不同的酮还原酶(表位型酮还原酶(epitype ketoreductase))的基因导入柔红霉素生产菌,对柔红霉素的生物合成途径进行修饰,来直接发酵生产表柔红霉素(非专利文献1)。表柔红霉素的氨基糖部分的羟基的立体构象与表柔比星相同,因而,在表柔比星的生产方面,表柔红霉素是极有用的初始原料。有报告称,在导入了除虫菌素生物合成相关的表位型酮还原酶基因(avrE)时,表柔红霉素的生产量是最高的,但其生产量也仅仅不过是约54 μg/mL,尚未达到可实用化的水平。此外,有专利申请称,对该研究所得的表柔红霉素生产菌进行突变原处理,将表柔红霉素的生产性提高到100 μg/mL以上(专利文献1),但实施例中并未记载所取得的突变株的具体情况。

[0012] 专利文献1:国际专利公开公报W02006/111561 A1号

[0013] 非专利文献1:Madduri, K. 等著,“Nature Biotechnology”,(美国),1998年,第16卷,p. 69-74

发明内容

[0014] 发明所要解决的问题

[0015] 本发明的课题是开发高效生产表柔红霉素等非天然型柔红霉素衍生物的微生物。

[0016] 解决问题的方法

[0017] 本发明人等着眼于导入宿主中的表位型酮还原酶基因所编码的酶的底物特异性影响柔红霉素衍生物生产性的可能性,对各种放线菌来源的表位型酮还原酶基因进行了比较和评价,结果令人惊奇地发现:导入了L-表万古胺(L-epivancosamine)生物合成相关的表位型酮还原酶基因的转化体能够生产出相当于导入了avrE基因的转化体的约3倍的表柔红霉素,从而完成了本发明。

[0018] 即,本发明作为提高了柔红霉素衍生物的生产性的转化体,提供导入了L-表万古胺生物合成相关的表位型酮还原酶基因的转化体。此外,本发明提供包括培养本发明的转化体、并从所得培养液中收集柔红霉素衍生物的步骤的柔红霉素衍生物的制造方法。而且,本发明还提供利用本发明的转化体生产的柔红霉素衍生物。

[0019] 因此,本发明如下:

[0020] (1) 在天然具有生产柔红霉素(Daunorubicin)的能力的放线菌中导入与L-表万古胺(L-epivancosamine)的生物合成相关的酮还原酶基因而得到的转化体。

[0021] (2) 上述(1)所述的转化体,该转化体生产表柔红霉素(Epidaunorubicin)作为柔红霉素衍生物。

[0022] (3) 上述 (1) 或 (2) 所述的转化体,其中,与 L-表万古胺的生物合成相关的酮还原酶基因是:

[0023] 编码包含 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列的蛋白质的基因;

[0024] 编码下述蛋白质的基因,所述蛋白质包含在 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列中缺失、取代或添加 1 个或数个氨基酸而得到的氨基酸序列、且具有酮还原酶活性;或

[0025] 编码下述蛋白质的基因,所述蛋白质与 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性、且具有酮还原酶活性。

[0026] (4) 上述 (1) 或 (2) 所述的转化体,其中,与 L-表万古胺的生物合成相关的酮还原酶基因由以下的 a) 或者 b) 的 DNA 组成:

[0027] a) 由 SEQ ID NO:2 所表示的碱基序列组成的 DNA;

[0028] b) 与由 SEQ ID NO:2 所表示的碱基序列的互补碱基序列组成的 DNA 在严格条件下杂交、且编码具有酮还原酶活性的蛋白质的 DNA。

[0029] (5) 上述 (1) ~ (4) 所述的转化体,其中,宿主放线菌为天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*)。

[0030] (6) 柔红霉素衍生物的制造方法,该制造方法包括培养上述 (1) ~ (5) 所述的转化体、并从培养液收集柔红霉素衍生物的步骤。

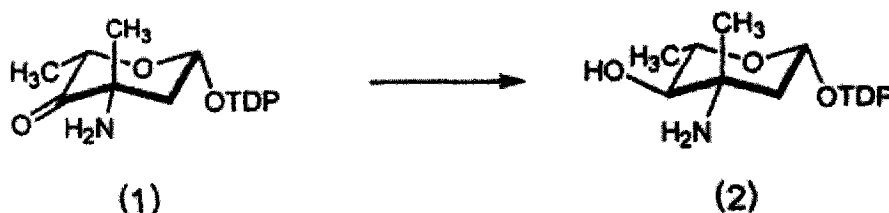
[0031] 发明的具体实施方式

[0032] 本发明的转化体可以以天然具有生产柔红霉素的能力的生物作为宿主来获得。优选为放线菌,作为生产柔红霉素的放线菌,已知有 *Streptomyces peuceticus*、天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*),它们可以用作用于制备本发明的转化体的宿主。此外,巴龙霉素 (baumycin) 是用柔红霉素的氨基糖 (L-柔红糖胺 (L-daunosamine)) 部分被修饰而得到的物质生物合成柔红霉素的中间体,因而生产巴龙霉素的放线菌也可以作为宿主加以利用。此外,优选使用在上述的柔红霉素或巴龙霉素生产菌中,通过缺损与柔红霉素的 L-柔红糖胺部分的 4 位羟基生物合成相关的酮还原酶基因,从而丧失了柔红霉素生产能力的菌株作为宿主。

[0033] 导入宿主的基因优选是编码与 L-表万古胺或其衍生物的 4 位羟基生物合成相关的表位型酮还原酶的基因。L-表万古胺是作为放线菌来源的抗生素——氯伊瑞霉素 (chloroeremomycin) 的一部分而天然出现的氨基糖,在氯伊瑞霉素生物合成基因中发现的表位型酮还原酶基因 [Chen, H. 等著,“Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America”, (美国),2000 年,第 97 卷, p. 11942-11947 (非专利文献 2)] 可以用于本发明。以下示出了表位型酮还原酶基因所参与的反应的一例:

[0034] [化学式 3]

[0035]



[0036] 在该反应中,胸苷-5'-二磷酸 (TDP)-4-酮-L-万古胺 [化合物 (1)] 的 4 位氧基

(オキソ, oxo) 被转换为羟基, 从而生成了 TDP-L- 表万古胺 [化合物 (2)]。

[0037] 导入宿主的基因优选为编码 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的基因, 更优选为由 SEQ ID NO:2 的碱基序列的 DNA 组成的基因。此外, 制作生产氯伊瑞霉素等包含 L- 表万古胺的次级代谢产物的微生物的基因组 DNA 文库, 采用以 SEQ ID NO:2 的碱基序列的 DNA 作为探针的杂交方法, 可以分离出可在本发明中使用的表位型酮还原酶基因。而且, 即使不对生产包含 L- 表万古胺的次级代谢产物的微生物进行鉴定, 使用从土壤等环境试样中直接抽提的 DNA 制作文库, 也可以同样地分离出可用于本发明的表位型酮还原酶基因。作为杂交条件, 优选在“严格条件”下进行。“严格条件”是指: 杂交后, 在高温低盐浓度溶液中进行膜的洗涤操作; 例如如下洗涤条件: 于 60℃、2×SSC 浓度 (1×SSC:15mmol/L 柠檬酸三钠、150mmol/L 氯化钠)、0.5% SDS

[0038]

溶液中进行 20 分钟。对于包含 SEQ ID NO:2 的碱基序列的 DNA 的质粒 pEVA118, 包含该质粒的大肠杆菌转化体已于平成 19(2007)年 8 月 14 日, 保藏在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(〒305-8566 日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地中央第 6), 国际保藏号为 FERM BP-10898。

[0039] 此外, 还可以使用编码由与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列基本上等同的氨基酸序列组成的蛋白质的基因, 例如下述基因: 编码包含 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列、且具有酮还原酶活性的蛋白质的基因; 编码包含在 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列中缺失、取代或添加 1 个或数个氨基酸而得到的氨基酸、且具有酮还原酶活性的蛋白质的基因; 或者, 编码与 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性、且具有酮还原酶活性的蛋白质的基因。而且, 本说明书中的“酮还原酶活性”是指: 将 4- 酮-L- 万古胺或其衍生物 [例如前述反应式中的化合物 (1)] 的 4 位氧基 (オキソ, oxo) 转换为羟基 (表位型) 的酮还原活性。

[0040] 进行“缺失、取代或添加”等修饰的氨基酸的数目, 对其没有特殊限定, 只要不影响酮还原酶活性即可, 例如为 1 ~ 20 个, 优选 1 ~ 10 个、更优选 1 ~ 5 个、更优选 1 ~ 3 个。

[0041] 作为“不影响活性的修饰”的例子, 可以列举出保守取代。“保守取代”是指: 将 1 个或数个氨基酸残基替换为其它化学上类似的氨基酸残基, 而不在实质上改变多肽的活性。可以列举出例如: 对于将某疏水性氨基酸残基取代成其它疏水性氨基酸残基, 或者将某极性氨基酸残基取代成具有相同电荷的其它极性氨基酸残基。可以进行这种取代的功能上类似的氨基酸, 按氨基酸分类是本技术领域公知的。具体地, 作为非极性 (疏水性) 氨基酸可以列举出丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸等。作为极性 (中性) 氨基酸可以列举出甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等。作为带正电荷的 (碱性) 氨基酸, 可以列举出精氨酸、组氨酸、赖氨酸等。此外, 作为带负电荷的 (酸性) 氨基酸可以列举出天冬氨酸、谷氨酸等。

[0042] 作为能够在本发明中使用的基因, 可以列举出编码与 SEQ ID NO:1 所表示的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性、且具有酮还原酶活性的蛋白质的基因, 优选可以具有 95%

以上的同一性、更优选 98% 以上的同一性、特别优选 99% 以上的同一性。而且,本说明书中的“同一性(identity)”是指:在本领域技术人员公知的同源性检索程序 FASTA3[Science, 227, 1435-1441(1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448(1988); <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]中,采用默认(初始设定)参数计算出的数值。

[0043] 将基因导入宿主可以利用混合原生质体和目的 DNA 的方法、利用噬菌体的方法、利用接合转移的方法等常规方法,可以在考虑宿主性质的基础上选择适当的方法来实现。为了挑选导入了基因的菌株,希望将作为目标的表位型酮还原酶基因与包含选择标记基因的载体一起导入。对于选择标记基因没有限定,只要能够挑选出导入了表位型酮还原酶基因的菌株,优选卡那霉素抗性基因、链霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、紫霉素抗性基因或者安普霉素(apramycin)抗性基因等。优选在导入的表位型酮还原酶基因中添加能够在宿主中发挥功能的启动子序列,红霉素抗性基因来源的 *ermE** 启动子 [Schmitt-John, T. and Engels, J. W. 著,“Applied Microbiology and Biotechnology”, (德国), 1992 年,第 36 卷, p. 493-498 (非专利文献 3)]、[Bibb, M. J. 等著,“Molecular Microbiology”, (英国), 1994 年,第 14 卷, p. 533-545 (非专利文献 4)] 等是优选的例子。作为表位型酮还原酶基因在宿主内的存在状态,可以将其导入可在染色体外自主复制的质粒,或者将其导入染色体中。此外,还可以采用以表位型酮还原酶基因取代宿主的与柔红霉素的 L- 柔红糖胺部分的 4 位羟基生物合成相关的酮还原酶基因的方法来进行导入。作为取代基因的方法,可以利用在放线菌中通常使用的方法 [Practical Streptomyces Genetics, “The John Innes Foundation”, (英国), Norwick, 2000 年, p. 311-338 (非专利文献 5)]。

[0044] 本发明的转化体所生产的柔红霉素衍生物是将柔红霉素的 L- 柔红糖胺部分的 4 位羟基反转而得到的柔红霉素衍生物。优选为表柔红霉素以及表柔比星、更优选为表柔红霉素。

[0045] 采用常规方法培养本发明的转化体,可以生产柔红霉素衍生物。在培养基方面,作为常规成分例如碳源,可以使用葡萄糖、蔗糖、水飴(水飴)、糊精、淀粉、甘油、糖蜜、动植物油等。此外,作为氮源,大豆粉、小麦胚芽、玉米浸出液、棉子粕、肉提取物、多蛋白胨、麦芽提取物、酵母提取物、硫酸铵、硝酸钠、尿素等。此外,视需要添加能够产生钠、钾、钙、镁、钴、氯、磷酸(磷酸氢二钾等)、硫酸(硫酸镁等)以及其它离子的无机盐类也是有效的。此外,视需要还可以添加硫胺(硫胺盐酸盐等)等各种维生素,谷氨酸(谷氨酸钠等)、天冬酰胺(DL- 天冬酰胺等)等氨基酸,核苷酸等微量营养素,抗生素等选择药物。而且,可以适当添加能够帮助菌体发育、促进柔红霉素衍生物生产的有机物和无机物。

[0046] 培养基的 pH 为例如 pH5.5 ~ pH8 左右。作为培养方法,可以采用需氧条件下的固体培养法、振荡培养法、通气搅拌培养法或深层需氧培养法来进行,特别是,深层需氧培养法是最为合适的。培养中的适当温度是 15°C ~ 40°C,多数情况下在 25°C ~ 35°C 左右进行生长。柔红霉素衍生物的生产因培养基和培养条件、或所使用的宿主而异,在任何培养法中,蓄积通常均是在 2 天 ~ 10 天达到最高。当培养中的柔红霉素衍生物的量达到最高时停止培养,然后从培养物分离、纯化目的物质。

[0047] 为了从培养本发明的转化体所得的培养物收集柔红霉素衍生物,可以单独或适当组合使用利用了其性状的常规分离手段、例如溶剂抽提法、离子交换树脂法、吸附或分配柱层析法、凝胶过滤法、透析法、沉淀法、结晶化法等来进行抽提纯化。为了进一步纯化柔红

霉素衍生物,可以使用硅胶、氧化铝等吸附剂、Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司制造) 或 TOYOPEARLHW-40 (东曹公司制造) 等来进行层析。

[0048] 以下示出本发明的实施例,但这仅仅是一些例子,而非对本发明的限定,本发明还包括未在这里示例的全部的许多改变或修饰。

[0049] 实施例 1

[0050] 包含于天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 的柔红霉素生物合成基因中的酮还原酶基因的克隆

[0051] 将天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 接种于改进 YEME 培养基 (0.3% DIFCO 酵母提取物、0.5% DIFCO 细菌用蛋白胨、0.3% 氧化麦芽 (オキシドモルト) 提取物、1% 葡萄糖、3% 蔗糖、5mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 50mL 中, 28℃、220rpm 振荡培养 24 小时。将培养液用 $6300 \times g$ 离心 10 分钟, 倾泻出上清, 并回收菌体。冻干菌体后, 使用 ISOPLANT (日本基因公司制造) 按附带的操作说明, 制备了基因组 DNA。

[0052] 将制备的基因组 DNA 用 *Sau3AI* 部分消化, 进行低熔点琼脂糖凝胶电泳, 采用常规方法回收了 9 ~ 23kb 的 DNA 片段。使用 DNA 连接试剂盒 ver. 2 (宝酒造株式会社制造) 和噬菌体载体 EMBL3/*Bam*HI 载体试剂盒 (Stratagene 公司制造) 将回收的 DNA 片段连接起来, 使用 MaxPlax LambdaPackaging Extracts (EPICENTRE Biotechnologies 公司制造) 进行了体外 (invitro) 包装。然后, 使该重组噬菌体感染大肠杆菌 XL1-Blue MRA (P2), 在平板上形成噬菌斑, 以此作为基因组 DNA 文库。

[0053] 另一方面, 用于对基因组 DNA 文库进行筛选的探针如下地制备。首先, 采用上述的方法从 *Streptomyces peuceticus* ATCC29050 株制备了基因组 DNA。为了以该基因组 DNA 作为模板、采用 PCR 法扩增编码 4-酮还原酶的 *dnmV* 基因 [Otten, S. L. 等著, “Journal of Bacteriology”, (美国), 1997 年, 第 179 卷、p. 4446-4450 (非专利文献 6)], 合成了以下的合成寡核苷酸。

[0054] SP-*dnmV* N : 5' -ATGCGGGTCGTGGTTCTGGG-3' (SEQ ID NO :3)

[0055] SP-*dnmV* C : 5' -CTAGGCCGGGGCGCCGTGCG-3' (SEQ ID NO :4)

[0056] PCR 条件如下 : 使用约 1 μ g 的基因组 DNA 和 1 μ mol/L 的各引物, 使用 LA Taq DNA 聚合酶 (宝酒造株式会社制造) 按以下的循环条件进行——94℃ · 5 分钟、(94℃ · 30 秒、48℃ · 30 秒、72℃ · 1 分钟) × 25 次、72℃ · 7 分钟。结果特异性地扩增出了约 0.9kbp 的 DNA 片段。对该 DNA 片段的碱基序列进行了分析, 结果确认其为作为目标的 *dnmV* 基因, 因而将该 DNA 片段用作探针。

[0057] 基因组 DNA 文库的筛选使用 ECL direct DNA/RNA labeling & detectionsystem (Amersham Pharmacia Biotech 公司制造) 进行。按照附带的操作说明, 对上述的约 0.9kbp 的 DNA 片段 100ng 进行标记。以此为探针, 通过噬菌斑杂交对基因组 DNA 文库进行了筛选, 得到了 3 个阳性克隆。

[0058] 对这些克隆的噬菌体 DNA 进行了分离、纯化, 对由探针所杂交的区域周围的 7330bp 构成的碱基序列 (SEQ ID NO :5) 进行了测定, 结果与已报告的柔红霉素生物合成基因群显示出高同源性, 确认了其包含编码与天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 的柔红霉素生物合成相关的酮还原酶的 *dnmV* 基因。

[0059] 实施例 2

[0060] 天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 的 dnmV 基因破坏用质粒 pDDNMV 的构建

[0061] 通过在翻译区域中插入终止密码子来破坏 dnmV 基因,以实施例 1 中分离的 DNA 片段作为模板,采用两步 PCR 法制作了含插入了终止密码子的 dnmV 基因的 DNA 片段。使用了下述引物:如下地包含 HindIII 或 XbaI 消化位点的引物,以及被设计成使得在从 dnmV 基因的起始密码子起算的第 84 位的酪氨酸 (TAC) 的位置插入终止密码子 TAG 的引物。

[0062] Dau5-HindIII

[0063] 5' -GGGAAGCTTGATCGCCCTCACGGAAGTGCAGGCGCGG-3' (SEQ IDNO:7)

[0064] dnmV-84Yc

[0065] 5' -CGCAGATGCGACTACGTCATCTCC-3' (下划线部分为终止密码子,SEQID NO:8)

[0066] Dau3-XbaI

[0067] 5' -GGGTCTAGAGCCGGCATGCGGATCGGCATGGAGGTG-3' (SEQ IDNO:9)

[0068] 第 1 步 PCR 反应是这样进行的:在 50 μ L 的反应液中,使用引物 Dau5-HindIII 和 dnmV-84Yc (各 0.3 μ mol/L) 以及模板 DNA 1 μ g,利用 KOD PlusDNA 聚合酶 (东洋纺织株式会社制造) 按以下的循环条件进行。94 $^{\circ}$ C • 2 分钟, (94 $^{\circ}$ C • 15 秒、50 $^{\circ}$ C • 30 秒、68 $^{\circ}$ C • 1 分钟 30 秒) $\times$ 25 次。

[0069] 将该 PCR 反应产物使用 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche 公司制造) 进行纯化,得到了 50 μ L 的 DNA 溶液。在其中取 20 μ L 用作第二步 PCR 反应的引物。PCR 反应是这样进行的:在 50 μ L 的反应液中,使用 0.3 μ mol/L 的 Dau3-XbaI (作为另一个引物)、模板 DNA 1 μ g,利用 KOD PlusDNA 聚合酶 (东洋纺织株式会社制造) 按以下的循环条件进行。94 $^{\circ}$ C • 2 分钟, (94 $^{\circ}$ C • 15 秒、50 $^{\circ}$ C • 30 秒、68 $^{\circ}$ C • 4 分钟) $\times$ 25 次。其结果,特异性地扩增出了约 3kbp 的 DNA 片段,因而用 HindIII 和 XbaI 进行双重消化,并克隆到 pUC119 的 HindIII 和 XbaI 位点。

[0070] 对克隆的 DNA 片段的碱基序列进行了解析,确定其为作为目标的包含插入有终止密码子的 dnmV 基因的 DNA 片段。

[0071] 将放线菌的接合转移用质粒 pSET152 [Bierman, M. 等著,“Gene”, (荷兰), 1992 年,第 116 卷, p. 43-49 (非专利文献 7)] 用 SphI 消化,在 T4DNA 聚合酶进行平滑化后,与 HindIII 接头 (宝酒造株式会社制造) 连接,构建了 pSET153。将 pSET153 来源的约 2.8kbp 的 HindIII-XbaI 片段与包含插入有终止密码子的 dnmV 基因的约 3kbp 的 HindIII-XbaI 片段连接起来,得到了能够进行接合转移的 dnmV 基因破坏用质粒 pDDNMV。

[0072] 实施例 3

[0073] 利用 dnmV 基因破坏用质粒 pDDNMV 构建 dnmV 破坏株

[0074] 将作为柔红霉素生产菌的天蓝淡红链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 涂布于 MS 琼脂培养基 (2% S 大豆粉、2% 甘露醇、2% 琼脂), 28 $^{\circ}$ C 培养 7 日。培养后,用 2 $\times$ YT Bros (1.6% DIFCO 细菌用胰蛋白胨、1% DIFCO 细菌用酵母提取物、0.5% NaCl) 3mL 刮取孢子, 50 $^{\circ}$ C 热冲击处理 10 分钟,制备了宿主的孢子液。

[0075] 另一方面,将携带质粒 pDDNMV 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ET12567/pUZ8002 株接种于所含氯霉素、卡那霉素和安普霉素的浓度分别为 25 μ g/mL、25 μ g/mL 和 50 μ g/mL 的 LB 液体培养基 (1% DIFCO 细菌用胰蛋白胨、0.5% DIFCO 酵母提取物、0.5% NaCl、0.1%

葡萄糖)100mL中,37℃培养过夜,制备了前培养液。将前培养液接种到与前培养时相同的液体培养基中,使得其终浓度为1%,37℃培养约4小时后,用LB液体培养基洗涤2次,最终悬浮于10mL的LB液体培养基中,以此为大肠杆菌液。

[0076] 将如上述制备的宿主孢子液500μL以及大肠杆菌液500μL混合起来并收集菌体,然后涂布于添加有终浓度10mmol/L的MgCl₂的MS琼脂培养基。28℃培养20小时后,再用含安普霉素1mg以及萘啶酸1.5mg的灭菌水1mL铺设灭菌水层,进一步于28℃培养5天,获得了安普霉素抗性株。

[0077] 对于所得的安普霉素抗性株,使用MagExtractor基因组DNA提取仪(东洋纺织株式会社制造)按规程制备基因组DNA,通过PCR以及Southern印迹分析确认了pDDNMV通过同源重组插入了染色体。

[0078] 将上述同源重组体接种于改进YEME培养基(50mL),28℃振荡培养2天,将其中的1mL再接种于新的改进YEME培养基(50mL)中,进行了传代培养。重复该操作5次后,将稀释成适当活菌数的培养液涂布于MS琼脂培养基,28℃培养4日。将生长出的菌落复制到含20μg/mL安普霉素的MS琼脂培养基和未添加的MS琼脂培养基上,挑选出7株在含安普霉素培养基中无法生长繁育的安普霉素敏感性株。

[0079] 制备所得安普霉素敏感性株的基因组DNA,利用引物Da25(5'-ATGCTGGGCATCTACGTC-3'、SEQ ID NO:10)与DaBR(5'-ACCGTACTCGTGCACCGA-3'、SEQ ID NO:11)的组合进行PCR反应,获得了约1.5kbp的扩增DNA片段。对这些扩增DNA片段的碱基序列进行了分析,结果为:有6株是按设计的那样导入了终止密码子的dnmV基因破坏株,有1株保持了原来的碱基序列。

[0080] 此外,为了确认这些株的柔红霉素生产性,将其接种于在250mL容量三角烧瓶中制备的液体生产培养基[Komiyama,T.等著,“The Journal ofAntibiotics”,(日本),1977年,第30卷,p.619-621(非专利文献8)]40mL,28℃培养2日后,将培养液1mL接种于相同的液体生产培养基20mL中,32℃振荡培养7天。为了抽提菌体生产物,将1mL培养液、1mL甲醇、70μL的50% H₂SO₄装入15mL容量的Falcon离心管中,振荡1小时后,2000×g离心10分钟,将其上清用于HPLC分析。结果确定:6株dnmV基因破坏株不生产柔红霉素,只有恢复为与亲本株相同的碱基序列的1株生产柔红霉素。

[0081] 实施例4

[0082] 以dnmV基因破坏株为宿主表达各酮还原酶基因

[0083] 将含ermE*启动子的质粒pIJ4070[Leskiw, B.K.等著,“Proceedings of theNational Academy of Sciences of the United States of America”,(美国),1991年,第88卷,p.2461-2465(非专利文献9)]用EcoRI以及BamHI双重消化,通过电泳分级后,将含ermE*启动子的约0.3kbp的EcoRI-BamHI片段从凝胶中抽提出来。将该DNA片段插入质粒pSET152的EcoRI以及BamHI位点,得到了质粒pSET152-E*。

[0084] 为了从明治制果株式会社拥有的麦迪霉素生产菌(*Streptomyces mycarofaciens*)和红霉素生产菌(*Saccharopolyspora erythraea*),作为除虫菌素生产菌的阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)JCM5070株,作为竹桃霉素生产菌的橄榄色链霉菌(*Streptomyces olivocromogenes*)NBRC 12444株中分离出与各种抗生素中所含的糖质的生物合成相关的酮还原酶基因(orf29、eryBIV、avrE、oleU),以各菌株的基因组DNA

为模板,使用以下引物进行了 PCR。即,对于麦迪霉素生产菌使用了 orf29N-BglIII 和 orf29C-XbaI,对于红霉素生产菌使用了 eryBIVN-BamHI 和 eryBIVC-XbaI,对于除虫菌素生产菌使用了 avrEN-BamHI 和 avrEC-XbaI,对于竹桃霉素生产菌使用了 oleUN-BamHI 和 oleUC-XbaI。

[0085] orf29N-BglIII

[0086] 5' -GGGAGATCTAGCGAAGGAGAAGTATGAGGCTCACTACCG-3' (SEQ ID NO:12)

[0087] orf29C-XbaI

[0088] 5' -GGGTCTAGATCAAGAACTCACCGCCGG-3' (SEQ ID NO:13)

[0089] eryBIVN-BamHI

[0090] 5' -GGGGGATCCAGCGAAGGAGCAAAGCTCCGATGAATGGGA-3' (SEQ ID NO:14)

[0091] eryBIVC-XbaI

[0092] 5' -GGGTCTAGACTAGTGCTCCTCGGTGGG-3' (SEQ ID NO:15)

[0093] avrEN-BamHI

[0094] 5' -GGGGGATCCAGCGAAGGAGGGGCCACCAGATGGGG-3' (SEQ ID NO:16)

[0095] avrEC-XbaI

[0096] 5' -GGGTCTAGACTACACGTAAGCCGCCAC-3' (SEQ ID NO:17)

[0097] oleUN-BamHI

[0098] 5' -GGGGGATCCAGCGAAGGAGGCAGCGGCCCATGAGATGG-3' (SEQ ID NO:18)

[0099] oleUC-XbaI

[0100] 5' -GGGTCTAGATCATGCTGCTCCTCGCCGG-3' (SEQ ID NO:19)

[0101] PCR 反应是这样进行的:在 50 μ L 的反应液中,使用 0.3 μ mol/L 的各引物和作为模板的基因组 DNA 1 μ g,利用 KOD Plus DNA 聚合酶(东洋纺织株式会社制造)按以下的循环条件进行。94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 2 分钟,(94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10 秒、50 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒、68 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分钟) $\times$ 25 次。对于各 PCR 反应中扩增出的约 1kbpDNA 片段,对于麦迪霉素生产菌来源的 DNA 片段用 BglIII 以及 XbaI、对于其它 DNA 片段用 BamHI 以及 XbaI 进行双重消化后,将其插入到上述质粒 pSET152-E* 的 BamHI 和 XbaI 位点,获得了质粒 pMED-E(麦迪霉素生产菌来源基因)、质粒 pERY-E(红霉素生产菌来源基因)、质粒 pAVR-E(除虫菌素生产菌来源基因)、质粒 pOLE-E(竹桃霉素生产菌来源基因)。各质粒的插入片段的碱基序列分别如 SEQ ID NO:20、22、24 以及 26 所示。

[0102] 此外,对于氯伊瑞霉素生产菌(*Amiclatopsis orientalis*)的酮还原酶基因(evaE),全序列合成了由 SEQ ID NO:28 构成的 BamHI-XbaI 片段,将其插入质粒 pSET152-E* 的 BamHI 和 XbaI 位点,获得了质粒 pEVA-E。

[0103] 以实施例 3 所述的 dnmV 基因破坏株中的 1 株——DaN-1 株作为宿主,采用接合转移法导入上述的 5 种质粒。对于所得转化体,用上述液体生产培养基于 28 $^{\circ}$ C 培养 7 天(n=3),将菌体抽提物用于 HPLC 分析,分析了表柔红霉素的生产量。结果如下表所示,可知:在导入了氯伊瑞霉素生产菌来源的酮还原酶基因的转化体中,表柔红霉素的生产量显著地高。

[0104] [表 2]

[0105]

菌株	表柔红霉素生产量 ($\mu\text{g/mL}$)
DaN-1/pMED-E	21.0 ± 1.2
DaN-1/pERY-E	9.0 ± 0.6
DaN-1/pAVR-E	63.7 ± 2.4
DaN-1/pOLE-E	9.0 ± 1.0
DaN-1/pEVA-E	173.0 ± 5.2
DaN-1	0

[0106] 以上,通过特定实施方式对本发明进行了说明,本发明的范围中还包括对本领域技术人员而言显而易见的变形与改进。

[0107] 以下序列表中的数字栏目<223>中记载了“人工序列(ArtificialSequence)”的说明。SEQ ID NO:3、4、7 ~ 19、28 的各序列所表示的碱基序列是合成 DNA。

序列表

<110> 明治制果株式会社 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.)

<120> 非天然型抗生素的制造方法

<130> MEJ-811

<150> JP 2007-239001

<151> 2007-09-14

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 325

<212> PRT

<213> 东方拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis orientalis*)

<400> 1

Met	Lys	Leu	Ile	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	
Val	Thr	Arg	Ala	Leu	Ala	Gln	Gln	Pro	Ile	Arg	Leu	Arg	Ala	Val	Ala
			20					25						30	
Arg	Arg	Gln	Phe	Thr	Pro	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Thr	Val	Val
			35					40						45	
Ala	Ala	Asp	Leu	Thr	Asp	Arg	Val	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Gly
			50					55						60	
Ser	Asp	Ala	Val	Val	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ser	Asp	Gly	Gly	Trp	Arg	Ala
65					70					75					80
Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Ala	Glu	Arg	Val	Asn	Val	Gly	Val	Met	Arg	Asp
				85					90						95
Leu	Ile	Asp	Val	Thr	Gly	Ser	Asp	Asn	Gly	Thr	Pro	Pro	Val	Val	Val
			100						105					110	
Phe	Gly	Gly	Thr	Val	Ser	Gln	Val	Gly	Val	Pro	Pro	Arg	Glu	Pro	Leu
			115						120					125	
Asp	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Asn	Pro	Ala	Thr	Pro	Tyr	Asp	Ile	Gln	Lys
			130						135						140

Leu Thr Ala Glu Gln Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Asn Gly Gln Val	
145	150 155 160
Arg Gly Ile Ser Leu Arg Leu Pro Thr Ile Phe Gly Glu Thr Thr Ala	
	165 170 175
Gln Gly Ala Asn His Asp Arg Gly Val Val Ser Ser Met Ala Arg Arg	
	180 185 190
Ala Leu Asp Gly Gln Ala Leu Thr Ile Trp Gly Asp Gly Ser Val Arg	
	195 200 205
Arg Asp Val Val His Val Glu Asp Val Ala Ala Ala Phe Thr Ala Ala	
	210 215 220
Leu Ala Asn Pro Asp Ser Leu Val Gly Gly His Trp Leu Ile Gly Ala	
	225 230 235 240
Gly Arg Gly Asp Gln Leu Gly Glu Ile Phe Arg Leu Val Ala Arg Glu	
	245 250 255
Val Ala Glu Gln Thr Gly Gln Arg Pro Val Glu Val Thr Cys Val Glu	
	260 265 270
Pro Pro Ser His Ala Pro Glu Met Asp Phe Arg Ser Val Thr Ile Asp	
	275 280 285
Ser Ser Pro Phe Arg Ala Val Thr Gly Trp Arg Pro Glu Ile Ser Leu	
	290 295 300
Ser Glu Gly Val Arg Arg Thr Val Ala Ala Leu Thr Thr Ser Val His	
	305 310 315 320
Gly Lys Ala Arg Ala	
	325

<210>2

<211>978

<212>DNA

<213> 东方拟无枝酸菌

<400>2

atgaagctga tcaccgtgct cgggtgcgtcg ggcttcatcg gctcggctgt cacgcgtgca	60
ctggcgcagc agccaatccg gctgcgagcg gtggcgcgca ggcagttcac gcccgcgccc	120
ggccaagccg agacgaccgt cgtcgccgct gatctcaccg accgtgtcgc gctcgccgac	180
gcggtcgcgg gatcggacgc ggctgtgtac ctgcttctgt cagacggcgg atggcgcgcg	240
gtcgagaccg aggacgccga acgcgtgaac gtgggctgca tgcgggacct catcgacgtc	300
accggcagcg acaacgggac gccccgggtg gtggtgttcg gcggtaccgt ctcgcaggtc	360
ggtgtgccac ctcgggagcc gctcgacggc agcgagcccg acaacccggc gactccctac	420
gacatacaga agctgacagc ggaacagatc ctcaagaagg ccacggcaaa tggccaggtg	480

cgcggcacatca gcctgcgtct gccgacgata ttcggtgaaa ccacggcaca aggcgcgaac	540
cacgaccgcg gtgtcgtgtc gtccatggcg cggcgagcgc tcgacggcca ggcactcacc	600
atctggggcg acggcagcgt gcgacgcgac gtcgtccatg tcgaggacgt cgcggcggcg	660
ttcacgcggg cactggccaa cccgattcc cttgtcggcg gccactggct gatcggcgcg	720
ggccgaggcg atcagcttgg ggagattttc cgctcgtgg cacgggaagt ggccgagcag	780
accgggcage gcccggtcga ggtgacctgt gtggaaccac cgtcgcacgc acctgagatg	840
gatttccgca gcgtcaccat cgattcctcg ccgttccggg cggtcaccgg ctggcgccca	900
gagatttcgc tgtccgaagg agtgcgtcgc actgtcgccg cattgacgac atcagttcat	960
ggaaaggctc gcgcatga	978

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>3

atgcgggtcg tggttctggg

20

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>4

ctaggccggg gcgccgtgcg

20

<210>5

<211>7330

<212>DNA

<213> 天蓝淡红链霉菌 (Streptomyces coeruleorubidus)

<220>

<221>CDS

<222>(1069).. (1992)

<223>dnmV, 酮还原酶

<400>5

gategccctc acggaactgc gcaggcgcgg cggggcgccg gccgggggtgc ggaccacggt	60
ggccgagata gacgcccggc tgttcgcgct gcacacggcg gtggcgagcg cgttgaccac	120
cgccgaccgg ctgcgcgacg acctcagcgg cgacctcgcc gcccgcggcc gcgccatgat	180
gacgcccttc cagtacgcca agctgctcgt caaccggcac tcggtgggcg tgggtggacga	240
ctgcctgatg ctcggtgggag gggccggata cagcaactcc caccgcgtgg cgcgcctgta	300
ccgcgatgtc cgggcgggcg ggttcatgca tccgtacaac ttcacggacg gcgtcgacta	360
cctgagcgaa gtggtgttgg gccgatgagc ggccggcgac gcgggaccgg gatccctgga	420
gtcggaggac gtggatgaag gcgcgggaac tggcggtgca gggggcgtag acgttcgagc	480
cggaggtgtt tccggacgag cgggggctgt tcgtctcacc gttccgggag gatgcgttca	540
cggccgcggt cggccatccg ctcttcccgg tcgggcagac gaatcacagc cggtcgcggc	600
gtgggggtgtt gcggggcggtg cactacaccg tgacgccgcc gggctcggcc aagtacgtgt	660
actgcgcccg tggcaggteg ctggacatcg tcgtcgacgt gcgggtcggc tccccgacgt	720
acggccggtg ggacgccgtc gagctggagc cgcgtgagtt ccgggcggtg tacttcccgg	780
tcgggggtggg gcacgccttc gtggccctgg aggacgacac cgtcatgtcg tacatgctgt	840
caggggagta cgtgcaggcc aacgaactcg ccgtgtcggg gctggacccg gccctcgggc	900
ttcccgtgcc ggggtgacctg gagcctctgc tgtccggccg ggaccgggcc gcaccgcccc	960
tggagcaggc ccgggcgcg gggacccttc cggagtacgc cgcgtgccgg gcggtcaggt	1020
cggagctgtg gccgcgggcc gggtcacgcg gagacgggtg aggcggac atg cgg gtc	1077
Met Arg Val	
gtg gtt ctg ggg gcg acg ggc agc gtc ggc cgg cag gtg tgt gcg gcg	1125
Val Val Leu Gly Ala Thr Gly Ser Val Gly Arg Gln Val Cys Ala Ala	
5 10 15	
tac cag gcg cac ggg tgg gac gtg cac ggg gtg gcc cgc cgc ccg gcg	1173
Tyr Gln Ala His Gly Trp Asp Val His Gly Val Ala Arg Arg Pro Ala	
20 25 30 35	
ccg cat ctg agc ggg tgc ggg ttc acg gag ctg gac ctc gcg gcc gcc	1221
Pro His Leu Ser Gly Cys Gly Phe Thr Glu Leu Asp Leu Ala Ala Ala	
40 45 50	
gcg cct ggg cgg atc gcc acg gtg ctg ggt gat ccc ccg gcg gac gtc	1269
Ala Pro Gly Arg Ile Ala Thr Val Leu Gly Asp Pro Pro Ala Asp Val	
55 60 65	
gtg gtc aac gcg gcg ggc ggc tgg ggc gac acc gag gag gag atg acg	1317
Val Val Asn Ala Ala Gly Gly Trp Gly Asp Thr Glu Glu Glu Met Thr	
70 75 80	
tac tcg cat ctg cga ctg gtg cga cgc ctg gtg gag gcg ctc gcg ctg	1365
Tyr Ser His Leu Arg Leu Val Arg Arg Leu Val Glu Ala Leu Ala Leu	

85	90	95	
ctc ccg ttc cgg ccc cgg ctg gtc cat ctg ggg tcg gtg cac gag tac			1413
Leu Pro Phe Arg Pro Arg Leu Val His Leu Gly Ser Val His Glu Tyr			
100	105	110	115
ggt ccc gtg ccg gcc ggc acg ctg ctg cac gag gac ctg ccg ccg gag			1461
Gly Pro Val Pro Ala Gly Thr Leu Leu His Glu Asp Leu Pro Pro Glu			
	120	125	130
ccg gtc acg ccg tac gcg cgc gtc aaa ctg gag acc tcg tcg gcc gtc			1509
Pro Val Thr Pro Tyr Ala Arg Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Ala Val			
	135	140	145
ctg acc gcg gcg cgg gcc ggt gtc ctg gac gcg gtg gtg ctg cgc gcg			1557
Leu Thr Ala Ala Arg Ala Gly Val Leu Asp Ala Val Val Leu Arg Ala			
	150	155	160
gcg aac atg tcg ggc ccg cat ccg ccg cag gag agt ttc ctg gcc gcc			1605
Ala Asn Met Ser Gly Pro His Pro Pro Gln Glu Ser Phe Leu Ala Ala			
	165	170	175
ctg atg gcg cgt atc agc acg gcg ttc gcg cac ggt ggg cgg ctg gag			1653
Leu Met Ala Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ala His Gly Gly Arg Leu Glu			
	180	185	190
ttg agc gtc gcg gac gca cgg cgg gac ttc gtc gac gtg cgg gac gtc			1701
Leu Ser Val Ala Asp Ala Arg Arg Asp Phe Val Asp Val Arg Asp Val			
	200	205	210
gca cag gcg gtg gtg cgg gcc ggg cgg gct ccg gcg gtc ggc gga ctg			1749
Ala Gln Ala Val Val Arg Ala Gly Arg Ala Pro Ala Val Gly Gly Leu			
	215	220	225
gtc gtc aac atc ggg cgc ggg gac gcc gtg ccg atc ggt gat ctg gtc			1797
Val Val Asn Ile Gly Arg Gly Asp Ala Val Pro Ile Gly Asp Leu Val			
	230	235	240
ggc tgg ctg ctg gag gcc gcc gcc ttc ccg gag gac cgg gtc gac cgc			1845
Gly Trp Leu Leu Glu Ala Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Val Asp Arg			
	245	250	255
cgg gag gcg ccg gtg cgg agc aag ggc ggc gac tgg acc cgg ctg gac			1893
Arg Glu Ala Pro Val Arg Ser Lys Gly Gly Asp Trp Thr Arg Leu Asp			
	260	265	270
atc ggg cgg gcc cgg cgg ttg ctg tcc tgg gcg ccg cgc atc ggc ctg			1941
Ile Gly Arg Ala Arg Arg Leu Leu Ser Trp Ala Pro Arg Ile Gly Leu			
	280	285	290
cgg gac tcc gtc cac agc atg tgg cgg acc gcg cac ggc gcc ccg gcc			1989
Arg Asp Ser Val His Ser Met Trp Arg Thr Ala His Gly Ala Pro Ala			

295	300	305	
tag ctcacagget tccgacgacc tcccgcaccg cgtggatcac cttctcctgc			2042
gcgtcgggac gcagcgaggg gtacatcggc agggagaaga tctcgccggc cagccgttcg			2102
gtcaccggca ggtcgccggg gccgtagccg aggtgggcga atccgctcat ggtgtggacg			2162
ggccaggggt agctgatgtt gagatggatg tcgtaggcgg tgagcgccctc caggatgcgg			2222
tcgcgttcgg ggtgacgcac cacgtacacg tagtagacgt ggtcggtgcc ctcggcggtc			2282
gtgggcagca ccaggccgtc gaggtcaccg agtccctcct cgtagcggcg ggcgacggcc			2342
cggcgccctt cgacataggc gtcgaggcgg cgcagtttcc ggcgcaggat ctcggcctgc			2402
acctcgctga gcctgctgtt gtgcccgggg gtgtccacga cgtagtagcg ctctcccatg			2462
ccgtagtagc gcaaccgccc cagccgcccg tcgacttccg cgtccggcgt gacgacggcg			2522
ccgccgtcac cgtaggcacc gaggaccttg gtcgggtaga aggagaaggc cgccgcatgc			2582
ccctgggtgc cgaccagccg tccgtgacgg cgggcaccgt gggcctgggc gcagtcctcc			2642
agcaccttca ggtcgtgctc ggcggcgagt tcgagcacgg gggtcatgtc cacgctctgt			2702
ccgtagaggt ggacgggcag caggcaccgg gtgcgcgggc cgatcaccga ccggagccgg			2762
ccggtgtcca tgaggtagtt ctctcgtgc acgtcgacga agacgggggt ggcgcccacg			2822
gcgtcgatgg ccaccacggt gggggcccg gtgttggaga ccgtcacgac ctcgtccccc			2882
gggccgatgc cgagcgcccg caggccgagg accagcgcgt tggtgccgtt gtcgacgccg			2942
gtgcagtacg gcagtcctg ataagcggcg aactcctcct cgaaagagcg gacgctggtc			3002
ccgagaataa gctggccgga ctcgaaatcc gtttccaccg catcgagaat gtcggtgcgt			3062
tcttcccgtt attcattgag gtattgccag acgtagggtg acacgtgact ccttgtcggg			3122
gcgcggtcag gcaagcgca cggacgcggc tgccgggact tccggaccgt tccggtcgat			3182
gccggggtcg gcccgcagaa tcgcgtgctg gaggtgctgg agacgggcgg acggttccac			3242
ccccagctcg ttaccaaag tcttgccgag ttgatgaag gcttcgaggg cctggctcgt			3302
gcggcccag cgatggaggg cgatcatgaa ttgggcccac aggttctcgt gcatgggggtg			3362
acgggcggtg agcgccgaca gtcgggcag caggcccgcg tgccggccca gcctcaggtc			3422
ggtctccatg cgggcctcca ggacgcgag cggctctcc tccaggcgcg ccacctccat			3482
gccgatccgc atgccggcgt gcacgtccac gagcgcgctc ccgcgccaca ggtcgagggc			3542
ctggcggaag cgtgcggagg ccaggtegag cccccccgc tcgcacgccc gcttgcctc			3602
ctcggcgaga cgctcgaagg cgtacacgtc ggtgtgggtg gggtcacgt cgagcaggta			3662
gccgcgtag caggtgcgca gcacgtcctt ggcgggtccg ttgtggctcg cgccgagggc			3722
cacggtgatg ccccgccgca cttgaaggat gtaggtctga aggggtgtca gcgcgtcgc			3782
cgggggcttg gttccccaga gtcctccat cagcgcgggc accggcacga cggttcctgc			3842
ctggagagcg agcagtgaga atacttgccg gggttttctg gctatcgggg tcaccgacgt			3902
gccattgtga tgtgcgacga gcgggcccac catattgatc tgcatgtccg gtgtgtctcc			3962
tctgtggcgt tccgatcgcg tcagcaggtg gcatatttcc ggcggccgaa ggatgtcctc			4022
ggcgggcccc gtttgcctgc tccatcctcg caagtgaatg cccgcatga aagtgtgtgc			4082
ggcacttgct gggattagtt catcacgtct cgatgtgaga aagtcacagt gggagcgccg			4142
gggagggate cgcaccgggt acacggcacg ggaccgcca ccgcgcggtg cgcggtgggc			4202
ggtgggcggt cccgtgccgg tcgcggccgg cggatcagcg cagccagacg ggcagttcgg			4262

tgagccgcgc	cgtctgggce	cccttcggg	accaccgcaa	ctcgtcgtac	ggcacggcca	4322
gtcgcgcctc	ggggaacctg	ctgcgcagta	cgccgatcat	cgtgcgcgac	tccagctggg	4382
cgagctgctc	cccgatgcag	tagtgcggcc	cgtcgccgaa	ggtgagccgc	cgccacgagg	4442
gacggtccgg	gtggaaggcg	tgcgggtcgt	cgtgatggcg	gccgtcgggtg	ttggtgccct	4502
cgatgtccac	cagcaccggc	gtccgcggg	gcagccggac	gccgccgatg	gtcacctccg	4562
tggcagcgaa	cctccacaac	gtgtagggca	ccggcggtg	gtagcgcagc	gcctcctcca	4622
cgaaccggga	gaccgcgtcc	tcgtcggcgt	ccgccgcgag	gcggccccgc	agcacctccg	4682
cgagcaggaa	gcccaggaag	gagccggtgg	tgctcgtggc	ggcgaagatg	agcccgggtga	4742
tcatgtagac	gagctggteg	tcggagaccg	agccgaactc	ggcctgcgcg	cgttcgtaca	4802
gcacgcgggt	catggtcggg	gtgtcgttcc	gccgggcccga	gtgcacggct	tcgaggagca	4862
ggctctccag	ggccgaggtg	tcgggcacgc	ccccggcagg	gtccgtgccg	tcacccccgc	4922
cgctctgcgg	gccgccgagg	ccgagtgcct	tgagaacgct	gacggcctcg	cgggccatcg	4982
ccggatcggt	gaccggcacg	ccgagcagct	cgcagatgac	caacagcggg	aagtggtaag	5042
cgaaccgcc	gatcagctcg	gccggtttgc	ccgaccgccc	ggaagtgtcg	gcgagttcgg	5102
tgagcagccg	gccggcgatg	gcggcgatgc	gatccgtccg	ctcggccagc	cggcgcgggt	5162
tgaacgcggg	tgcgtggatg	cggcgcaggc	gccggtgggc	ctcgccgtcc	acggcgatga	5222
gcgtgaacgg	acgcagctcc	ggaacggggga	tgctgagacc	gtcgtccacc	ccccgccagg	5282
cggcgggggc	gaggtcgggg	tccttcacga	accggggatc	ggccagcacc	tcgcgggcga	5342
ggcggtcatc	ggtgatgacc	caggcgggtc	cgcccgcggg	ggcgttcacc	tcgacgaccg	5402
ggccccctc	ccggaaggcg	tcgtgcacct	cgggcttgcg	ctgcatggtc	atcatgggac	5462
acgcgaacgg	gtcgacggcc	accggggcg	cctcgccgct	cacgaggcac	cgccccccgc	5522
cgcggggtag	ccctcccgca	gttcgaccac	cgagaagccg	gccccgtcgc	ggtcgagcag	5582
gtccgcccgc	cgccccctgg	gcgtgtcggc	gggctcgttc	tcgacggagc	cgccgagttc	5642
aacggcgcg	cggaccgtcg	cgctgcagtc	gcgcacggcg	aacagcacgg	cccagtgccg	5702
ccgtaccgcg	ccggtgacgc	ccagctcctg	ggtgccggcg	accggtgtgt	caccgatgtg	5762
ccagaccggg	tcggtgacgc	ccttcaggcc	ggtgtcggcc	ggagccaggc	cgagggtcgc	5822
cggatagaag	tcccgggcgg	ccccgatgcc	gtcggtcacc	agctcgaccc	agccgaccga	5882
gccgggcacg	cccgtcacct	ccgcgcctc	catgactccc	ttgcgccaga	ccgcgaacgc	5942
ggccccggcg	gggtcggcga	agaccgccat	ccggccgagg	ccgaggacgt	ccatcgggggt	6002
catgatgacc	tcgccgcccg	ccgtctcgac	ccgcttggtc	agtgcgtcgg	cgtcgtcgggt	6062
ggcgaagtac	acggtccaga	tggccggcat	gccgtgctgg	tcgttcccgg	gcccgtacgg	6122
ccggtggtag	ggggtgtcga	tctggtggcg	ggcgaccgcg	gcgaccagct	tcccgtcgga	6182
gctgaacgtc	gtgtatcccc	cggcgcccgg	gtcgtgacc	acggtggcgg	tccagccgaa	6242
caggccggtg	tagaagtcgg	ccgaggcggc	gacatcgggc	gaaccgaggt	cgaaccatgc	6302
gggggcgcgc	ggcgcgaaac	tggtcacgaa	tcgttccttt	cgatggatcg	gcacacgagc	6362
gtctgcgctc	gcggatgaga	cggacatctc	gcggatgaga	cggacatgcg	ggcggggcgg	6422
gccgccgccc	tcagtgcgcg	gtgtcgccga	cggcgggccg	gccggcctcc	cagagcttcg	6482
ccgcgaggcc	ggcgtcggcg	gtcgggcccgc	tcaccggggga	cagccgcccgg	tcgtgtagtg	6542
agccgcccgt	ggtcaactcc	tcggccggcg	cggacgccag	ccacacgagg	gtgtcggcgc	6602

```

ccttcgccgc ggagcgcagg aaggggttga accggaagta ggacgaggcg accgtgcccc 6662
gtccgatgcg ggtgcggacc tcgccgggt gatagctgac cgccagcacg tccggccagc 6722
gcctggcggc ctccgccgcg gtcattgatgt tggcctgttt ggacgtgccg tacgcctggc 6782
cggcgctgta gcggtgacgg tcgccgttga ggctcgtccgg gtcgatccgg ccctgggtgt 6842
acgcgtcgga cgaggtgagg atcagccgcc cgcccgcgag ccgctccccg agcagccgtg 6902
ccagcaggaa acccgcgaga tgattgacct ggatggtggc ctcgaacccg tcctgggtcg 6962
tggtgcgcga ccagaacatg ccgccggcgt tgctggccat gacatcgatg cgcgggtacc 7022
ggccccgcag ccgctcccc agatcgcgta cctggcgcgag ctcggcgaag tccgcgcgga 7082
aggcgtccgg ggccgggccc gcggtccggg ccacctcggt cgtgacggtc cgcagacgct 7142
cggggtcccc gccgacgagc acgacgcggg cccctggcg ggccgaccgc agggccgccc 7202
cccggccgat gccggacgtg gcccgggtga ccagcacctg ccggccccgac agggcgccgc 7262
gtggtgtccc gtggtacggg gtggggggccg tcatgccgcc gctacgcagc ctctcgttga 7322
cgaagatc 7330

```

<210>6

<211>307

<212>PRT

<213> 天蓝淡红链霉菌

<400>6

```

Met Arg Val Val Val Leu Gly Ala Thr Gly Ser Val Gly Arg Gln Val
1           5           10           15
Cys Ala Ala Tyr Gln Ala His Gly Trp Asp Val His Gly Val Ala Arg
20          25          30
Arg Pro Ala Pro His Leu Ser Gly Cys Gly Phe Thr Glu Leu Asp Leu
35          40          45
Ala Ala Ala Ala Pro Gly Arg Ile Ala Thr Val Leu Gly Asp Pro Pro
50          55          60
Ala Asp Val Val Val Asn Ala Ala Gly Gly Trp Gly Asp Thr Glu Glu
65          70          75          80
Glu Met Thr Tyr Ser His Leu Arg Leu Val Arg Arg Leu Val Glu Ala
85          90          95
Leu Ala Leu Leu Pro Phe Arg Pro Arg Leu Val His Leu Gly Ser Val
100         105         110
His Glu Tyr Gly Pro Val Pro Ala Gly Thr Leu Leu His Glu Asp Leu
115        120        125
Pro Pro Glu Pro Val Thr Pro Tyr Ala Arg Val Lys Leu Glu Thr Ser
130        135        140
Ser Ala Val Leu Thr Ala Ala Arg Ala Gly Val Leu Asp Ala Val Val

```

145	150	155	160
Leu Arg Ala Ala Asn Met Ser Gly Pro His Pro Pro Gln Glu Ser Phe			
	165	170	175
Leu Ala Ala Leu Met Ala Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ala His Gly Gly			
	180	185	190
Arg Leu Glu Leu Ser Val Ala Asp Ala Arg Arg Asp Phe Val Asp Val			
	195	200	205
Arg Asp Val Ala Gln Ala Val Val Arg Ala Gly Arg Ala Pro Ala Val			
	210	215	220
Gly Gly Leu Val Val Asn Ile Gly Arg Gly Asp Ala Val Pro Ile Gly			
225	230	235	240
Asp Leu Val Gly Trp Leu Leu Glu Ala Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg			
	245	250	255
Val Asp Arg Arg Glu Ala Pro Val Arg Ser Lys Gly Gly Asp Trp Thr			
	260	265	270
Arg Leu Asp Ile Gly Arg Ala Arg Arg Leu Leu Ser Trp Ala Pro Arg			
	275	280	285
Ile Gly Leu Arg Asp Ser Val His Ser Met Trp Arg Thr Ala His Gly			
	290	295	300
Ala Pro Ala			
305			

<210>7

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>7

gggaagcttg atcgccctca cggaactgcg caggcgcg

39

<210>8

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>8

cgcagatgcg actacgtcat ctcc

24

<210>9

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>9

gggtctagag ccggcatgcg gatcggcatg gaggtg

36

<210>10

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>10

atgctgggca tctacgtc

18

<210>11

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>11

accgtactcg tgcaccga

18

<210>12

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>12

gggtgatcaa gcgaaggaga agtatgaggc tcactaccg

39

<210>13

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>13

gggtctagat caagaactca ccgccgg

27

<210>14

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>14

gggggatcca gcgaaggagc aaagctccga tgaatggga

39

<210>15

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>15

gggtctagac tagtgctcct cggtggg

27

<210>16

<211>35

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>16

gggggatcca gcgaaggagg ggccaccaga tgggg

35

<210>17

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>17

gggtctagac tacacgtaag ccgccac

27

<210>18

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>18

gggggatcca gcgaaggagg cagcggcccc atgagatgg

39

<210>19

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>19

gggtctagat catgctgctc ctcgccgg

28

<210>20

<211>1049

<212>DNA

<213> 生米卡链霉菌 (Streptomyces mycarofaciens)

<220>

<221>CDS

<222>(21).. (1043)

<400>20

agatctagcg aaggagaagt atg agg ctc act acc gag ttg ttc aag cgg tcg 53

Met Arg Leu Thr Thr Glu Leu Phe Lys Arg Ser

1 5 10

cac cat ccg cgc ggg cca ttg gtc acg gtg ctc ggc gcg tcg gga ttc 101

His His Pro Arg Gly Pro Leu Val Thr Val Leu Gly Ala Ser Gly Phe

15 20 25

ctc ggg tcc gcc gtg gtg gcc gaa ctc gcc gca ctg ccg ctg cgc ttg 149

Leu Gly Ser Ala Val Val Ala Glu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Arg Leu

30 35 40

cgc ctg gtg gcg cgc ggt ccc agc cgt gtg ccg gcc gaa ccg gtg gcg 197

Arg Leu Val Ala Arg Gly Pro Ser Arg Val Pro Ala Glu Pro Val Ala

45 50 55

gac atc gag gtg cgc cgg acg gac ctc gcc cgg ccg gac gcc gtc gcg 245

Asp Ile Glu Val Arg Arg Thr Asp Leu Ala Arg Pro Asp Ala Val Ala

60 65 70 75

gcc gcc gcc gag ggc gcg gac gcc gtc gtt cat ctc gcg gcg ggg atc 293

Ala Ala Ala Glu Gly Ala Asp Ala Val Val His Leu Ala Ala Gly Ile

80 85 90

ggc gga cag cag tcc tgg cgc gcc gcc gac gag cac gcg gag cgg gtg 341

Gly Gly Gln Gln Ser Trp Arg Ala Ala Asp Glu His Ala Glu Arg Val

95 100 105

aac gtc ggc atg atg cgc gac ctt gtc gat gcg ctg cgc ggc cgg agc 389

Asn Val Gly Met Met Arg Asp Leu Val Asp Ala Leu Arg Gly Arg Ser

110	115	120	
ggc gcc cgg ccg gcc gtg gcc ttc gcc agc acg ctc cag gcc ggg tcc			437
Gly Ala Arg Pro Ala Val Ala Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ala Gly Ser			
125	130	135	
ccc acg ggc aac gcc gcc ccc ctg ggc ggc tac gca tcg cag aag atc			485
Pro Thr Gly Asn Ala Ala Pro Leu Gly Gly Tyr Ala Ser Gln Lys Ile			
140	145	150	155
gcc gcc gag ggg atc ctg cgc gag gcc acg gcc gag ggc gtc gtc cgc			533
Ala Ala Glu Gly Ile Leu Arg Glu Ala Thr Ala Glu Gly Val Val Arg			
160	165	170	
ggc gtc gtg ctg cgg ctg tcg acc ctg tac ggc cac agc ccg ctc tcc			581
Gly Val Val Leu Arg Leu Ser Thr Leu Tyr Gly His Ser Pro Leu Ser			
175	180	185	
ggc ggc gcc ggg cgc ggc gtg ctc gcg tcg atg acc cgc cgc gcc ctc			629
Gly Gly Ala Gly Arg Gly Val Leu Ala Ser Met Thr Arg Arg Ala Leu			
190	195	200	
gac ggc gaa gcc ctg acc atg tgg cat gac gga tcg gtc ggg cgc gac			677
Asp Gly Glu Ala Leu Thr Met Trp His Asp Gly Ser Val Gly Arg Asp			
205	210	215	
ttc ctc cac gtc cgg gac gct gcg ggc gcc ttc acg gct gcc ctg gag			725
Phe Leu His Val Arg Asp Ala Ala Gly Ala Phe Thr Ala Ala Leu Glu			
220	225	230	235
cat gcg gcg gag cta cag ggc gag ccc tgg atc gtc gca acc ggc cgc			773
His Ala Ala Glu Leu Gln Gly Glu Pro Trp Ile Val Ala Thr Gly Arg			
240	245	250	
ctg gag cgg ctc ggt gac gtg ttc acc gcc ctg gct ggt ctc gtg gcc			821
Leu Glu Arg Leu Gly Asp Val Phe Thr Ala Leu Ala Gly Leu Val Ala			
255	260	265	
gag cac acc ggc ggg act ccg gct ccg gtc gtc gcc gtg cca ccc ccc			869
Glu His Thr Gly Gly Thr Pro Ala Pro Val Val Ala Val Pro Pro Pro			
270	275	280	
gct tac gcc gaa gcg ggt gat ttc cac agc ccg gag tcc gac tcc gcc			917
Ala Tyr Ala Glu Ala Gly Asp Phe His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ala			
285	290	295	
gcc ttc cgg gct gtg acc ggc tgg gct ccc cgg gtg cgg ttc ccc gag			965
Ala Phe Arg Ala Val Thr Gly Trp Ala Pro Arg Val Arg Phe Pro Glu			
300	305	310	315
ggg ctg cgg gac atg gtc gcg gcg atc gcc gcc gtg cac ccc gca ccg			1013
Gly Leu Arg Asp Met Val Ala Ala Ile Ala Ala Val His Pro Ala Pro			

320	325	330	
ccg gct gcg cac ccg gcg gtg agt tct tga tctaga			1049
Pro Ala Ala His Pro Ala Val Ser Ser			
335	340		

<210>21

<211>340

<212>PRT

<213> 生米卡链霉菌

<400>21

Met Arg Leu Thr Thr Glu Leu Phe Lys Arg Ser His His Pro Arg Gly		
1	5	10
Pro Leu Val Thr Val Leu Gly Ala Ser Gly Phe Leu Gly Ser Ala Val		
	20	25
Val Ala Glu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Arg Leu Arg Leu Val Ala Arg		30
	35	40
Gly Pro Ser Arg Val Pro Ala Glu Pro Val Ala Asp Ile Glu Val Arg		45
	50	55
Arg Thr Asp Leu Ala Arg Pro Asp Ala Val Ala Ala Ala Ala Glu Gly		60
65	70	75
Ala Asp Ala Val Val His Leu Ala Ala Gly Ile Gly Gly Gln Gln Ser		
	85	90
Trp Arg Ala Ala Asp Glu His Ala Glu Arg Val Asn Val Gly Met Met		95
	100	105
Arg Asp Leu Val Asp Ala Leu Arg Gly Arg Ser Gly Ala Arg Pro Ala		110
	115	120
Val Ala Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ala Gly Ser Pro Thr Gly Asn Ala		125
	130	135
Ala Pro Leu Gly Gly Tyr Ala Ser Gln Lys Ile Ala Ala Glu Gly Ile		140
145	150	155
Leu Arg Glu Ala Thr Ala Glu Gly Val Val Arg Gly Val Val Leu Arg		
	165	170
Leu Ser Thr Leu Tyr Gly His Ser Pro Leu Ser Gly Gly Ala Gly Arg		175
	180	185
Gly Val Leu Ala Ser Met Thr Arg Arg Ala Leu Asp Gly Glu Ala Leu		190
	195	200
Thr Met Trp His Asp Gly Ser Val Gly Arg Asp Phe Leu His Val Arg		205
	210	215
		220

28

cgc gcc gac ctg ctg gaa ccg ggc cgg gcc gcc gcc gcg atc gag gac	245
Arg Ala Asp Leu Leu Glu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ile Glu Asp	
60 65 70	
gcc gac gtg atc gtg cac ctg gtg gcg cac gca gcg ggc ggt tcc acc	293
Ala Asp Val Ile Val His Leu Val Ala His Ala Ala Gly Gly Ser Thr	
75 80 85	
tgg cgc agc gcc acc tcc gac ccg gaa gcc gag cgg gtc aac gtc ggc	341
Trp Arg Ser Ala Thr Ser Asp Pro Glu Ala Glu Arg Val Asn Val Gly	
90 95 100 105	
ctg atg cac gac ctc gtc ggc gcg ctg cac gat cgc cgc agg tcg acg	389
Leu Met His Asp Leu Val Gly Ala Leu His Asp Arg Arg Arg Ser Thr	
110 115 120	
ccg ccc gtg ttg ctc tac gcg agc acc gca cag gcc gcg aac ccg tcg	437
Pro Pro Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Ala Gln Ala Ala Asn Pro Ser	
125 130 135	
gcg gcc agc agg tac gcg cag cag aag acc gag gcc gag cgc atc ctg	485
Ala Ala Ser Arg Tyr Ala Gln Gln Lys Thr Glu Ala Glu Arg Ile Leu	
140 145 150	
cgc aaa gcc acc gac gag ggc cgg gtg cgc ggc gtg atc ctg cgg ctg	533
Arg Lys Ala Thr Asp Glu Gly Arg Val Arg Gly Val Ile Leu Arg Leu	
155 160 165	
ccc gcc gtc tac ggc cag agc ggc ccg tcc ggc ccc atg ggg cgg ggc	581
Pro Ala Val Tyr Gly Gln Ser Gly Pro Ser Gly Pro Met Gly Arg Gly	
170 175 180 185	
gtg gtc gca gcg atg atc cgg cgt gcc ctc gcc ggc gag ccg ctc acc	629
Val Val Ala Ala Met Ile Arg Arg Ala Leu Ala Gly Glu Pro Leu Thr	
190 195 200	
atg tgg cac gac ggc ggc gtg cgc cgc gac ctg ctg cac gtc gag gac	677
Met Trp His Asp Gly Gly Val Arg Arg Asp Leu Leu His Val Glu Asp	
205 210 215	
gtg gcc acc gcg ttc gcc gcc gcg ctg gag cac cac gac gcg ctg gcc	725
Val Ala Thr Ala Phe Ala Ala Ala Leu Glu His His Asp Ala Leu Ala	
220 225 230	
ggc ggc acg tgg gcg ctg ggc gcc gac cga tcc gag ccg ctc ggc gac	773
Gly Gly Thr Trp Ala Leu Gly Ala Asp Arg Ser Glu Pro Leu Gly Asp	
235 240 245	
atc ttc cgg gcc gtc tcc ggc agc gtc gcc cgg cag acc ggc agc ccc	821
Ile Phe Arg Ala Val Ser Gly Ser Val Ala Arg Gln Thr Gly Ser Pro	
250 255 260 265	

gcc gtc gac gtg gtc acc gtg ccc gcg ccc gag cac gcc gag gcc aac	869
Ala Val Asp Val Val Thr Val Pro Ala Pro Glu His Ala Glu Ala Asn	
270 275 280	
gac ttc cgc agc gac gac atc gac tcc acc gag ttc cgc agc cgg acc	917
Asp Phe Arg Ser Asp Asp Ile Asp Ser Thr Glu Phe Arg Ser Arg Thr	
285 290 295	
ggc tgg cgc ccc cgg gtt tcc ctc acc gac ggc atc gac cgg acg gtg	965
Gly Trp Arg Pro Arg Val Ser Leu Thr Asp Gly Ile Asp Arg Thr Val	
300 305 310	
gcc gcc ctg acc ccc acc gag gag cac tag tctaga	1001
Ala Ala Leu Thr Pro Thr Glu Glu His	
315 320	

<210>23

<211>322

<212>PRT

<213> 糖多孢红霉菌

<400>23

Met Asn Gly Ile Ser Asp Ser Pro Arg Gln Leu Ile Thr Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
Ala Ser Gly Phe Val Gly Ser Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg Asp His	
20 25 30	
Pro Val Arg Leu Arg Ala Val Ser Arg Gly Gly Ala Pro Ala Val Pro	
35 40 45	
Pro Gly Ala Ala Glu Val Glu Asp Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Pro	
50 55 60	
Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ile Glu Asp Ala Asp Val Ile Val His Leu	
65 70 75 80	
Val Ala His Ala Ala Gly Gly Ser Thr Trp Arg Ser Ala Thr Ser Asp	
85 90 95	
Pro Glu Ala Glu Arg Val Asn Val Gly Leu Met His Asp Leu Val Gly	
100 105 110	
Ala Leu His Asp Arg Arg Arg Ser Thr Pro Pro Val Leu Leu Tyr Ala	
115 120 125	
Ser Thr Ala Gln Ala Ala Asn Pro Ser Ala Ala Ser Arg Tyr Ala Gln	
130 135 140	
Gln Lys Thr Glu Ala Glu Arg Ile Leu Arg Lys Ala Thr Asp Glu Gly	
145 150 155 160	

Arg Val Arg Gly Val Ile Leu Arg Leu Pro Ala Val Tyr Gly Gln Ser
 165 170 175
 Gly Pro Ser Gly Pro Met Gly Arg Gly Val Val Ala Ala Met Ile Arg
 180 185 190
 Arg Ala Leu Ala Gly Glu Pro Leu Thr Met Trp His Asp Gly Gly Val
 195 200 205
 Arg Arg Asp Leu Leu His Val Glu Asp Val Ala Thr Ala Phe Ala Ala
 210 215 220
 Ala Leu Glu His His Asp Ala Leu Ala Gly Gly Thr Trp Ala Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala Asp Arg Ser Glu Pro Leu Gly Asp Ile Phe Arg Ala Val Ser Gly
 245 250 255
 Ser Val Ala Arg Gln Thr Gly Ser Pro Ala Val Asp Val Val Thr Val
 260 265 270
 Pro Ala Pro Glu His Ala Glu Ala Asn Asp Phe Arg Ser Asp Asp Ile
 275 280 285
 Asp Ser Thr Glu Phe Arg Ser Arg Thr Gly Trp Arg Pro Arg Val Ser
 290 295 300
 Leu Thr Asp Gly Ile Asp Arg Thr Val Ala Ala Leu Thr Pro Thr Glu
 305 310 315 320
 Glu His

<210>24

<211>1064

<212>DNA

<213> 阿维链霉菌

<220>

<221>CDS

<222>(27)..(1058)

<400>24

ggatccagcg aaggaggggc caccag atg ggg cgg ttt tcg gtg tgc ccg ccc 53
 Met Gly Arg Phe Ser Val Cys Pro Pro
 1 5
 cgg ccg acc gga ata ctg aag agc atg ctg acg act ggg atg tgc gac 101
 Arg Pro Thr Gly Ile Leu Lys Ser Met Leu Thr Thr Gly Met Cys Asp
 10 15 20 25
 cga ccg ctg gtc gtc gta ctc gga gcc tcc ggc tat atc ggg tcg gcc 149

Arg	Pro	Leu	Val	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ser	Ala	
30				35				40								
gtc	gcg	gcg	gaa	ctc	gcc	cgg	tgg	ccg	gtc	ctg	ttg	cgg	ctg	gtg	gcc	197
Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Trp	Pro	Val	Leu	Leu	Arg	Leu	Val	Ala	
45				50				55								
cgg	cga	ccg	ggc	gtc	gtt	ccg	ccg	ggc	ggc	gcc	gcg	gag	acc	gag	acg	245
Arg	Arg	Pro	Gly	Val	Val	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Glu	Thr	
60				65				70								
cgt	acg	gcc	gac	ctg	acg	gcg	gcg	agc	gag	gtc	gcc	ctc	gcc	gtg	acg	293
Arg	Thr	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	
75				80				85								
gac	gcc	gac	gtg	gtg	atc	cac	ctg	gtc	gcg	cgc	ctc	acc	cag	gga	gcg	341
Asp	Ala	Asp	Val	Val	Ile	His	Leu	Val	Ala	Arg	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala	
90				95				100				105				
gca	tgg	cgg	gcg	gcg	gag	agc	gat	ccg	gtg	gcc	gag	cgg	gtg	aac	gtc	389
Ala	Trp	Arg	Ala	Ala	Glu	Ser	Asp	Pro	Val	Ala	Glu	Arg	Val	Asn	Val	
110				115				120								
ggg	gtg	atg	cac	gac	gtc	gtc	gcg	gcc	ctg	cgg	tcc	ggg	cgc	cgc	gcc	437
Gly	Val	Met	His	Asp	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Ala	
125				130				135								
ggg	ccg	ccc	ccg	gtg	gtg	gtg	ttc	gcc	ggg	tcg	gtc	tac	cag	gtg	ggc	485
Gly	Pro	Pro	Pro	Val	Val	Val	Phe	Ala	Gly	Ser	Val	Tyr	Gln	Val	Gly	
140				145				150								
cgc	ccg	ggt	cgg	gtc	gac	ggc	agt	gag	ccg	gac	gag	ccc	gtg	acg	gcc	533
Arg	Pro	Gly	Arg	Val	Asp	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Glu	Pro	Val	Thr	Ala	
155				160				165								
tat	gcc	cgt	cag	aaa	ctc	gac	gcc	gaa	cgg	acg	ttg	aag	tcc	gcc	acg	581
Tyr	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Leu	Lys	Ser	Ala	Thr	
170				175				180				185				
gtc	gag	ggt	gtc	ctg	cgg	ggg	atc	tcg	ctg	cgg	ctg	ccc	acc	gtc	tac	629
Val	Glu	Gly	Val	Leu	Arg	Gly	Ile	Ser	Leu	Arg	Leu	Pro	Thr	Val	Tyr	
190				195				200								
ggc	gcg	ggg	ccg	ggc	ccg	cag	ggc	aac	ggc	gtc	gtg	cag	gcg	atg	gtg	677
Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Asn	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Met	Val	
205				210				215								
ctc	cgg	gcg	ctc	gcc	gac	gag	gcc	ctc	acc	gtg	tgg	aac	gga	agc	gtg	725
Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Glu	Ala	Leu	Thr	Val	Trp	Asn	Gly	Ser	Val	
220				225				230								
gtg	gag	cgt	gac	ctg	gtg	cat	gtg	gag	gat	gtc	gcg	cag	gcc	ttc	gtg	773

Val Glu Arg Asp Leu Val His Val Glu Asp Val Ala Gln Ala Phe Val	
235 240 245	
agc tgc ctg gcg cac gcg gat gcg ctc gcc ggg cgg cac tgg ctg ctc	821
Ser Cys Leu Ala His Ala Asp Ala Leu Ala Gly Arg His Trp Leu Leu	
250 255 260 265	
ggc agc ggt cgt cct gtg acc gtc ccg cac ctc ttc ggt gcc atc gcc	869
Gly Ser Gly Arg Pro Val Thr Val Pro His Leu Phe Gly Ala Ile Ala	
270 275 280	
gcc ggc gtg tcc gcc cgc acc ggg cgc ccc gcg gtg ccc gtg acc gcg	917
Ala Gly Val Ser Ala Arg Thr Gly Arg Pro Ala Val Pro Val Thr Ala	
285 290 295	
gtg gac cct ccg gcg atg gcg acg gcg gcg gac ttc cac ggg acc gtc	965
Val Asp Pro Pro Ala Met Ala Thr Ala Ala Asp Phe His Gly Thr Val	
300 305 310	
gtc gac tcc tcg gcg ttc cgc gcg gtc acc ggg tgg cgg ccg cgg ctg	1013
Val Asp Ser Ser Ala Phe Arg Ala Val Thr Gly Trp Arg Pro Arg Leu	
315 320 325	
tcg ctt cag gag ggc ctg gac cac atg gtg gcg gct tac gtg tag	1058
Ser Leu Gln Glu Gly Leu Asp His Met Val Ala Ala Tyr Val	
330 335 340	
tctaga	1064

<210>25

<211>343

<212>PRT

<213>阿维链霉菌

<400>25

Met Gly Arg Phe Ser Val Cys Pro Pro Arg Pro Thr Gly Ile Leu Lys	
1 5 10 15	
Ser Met Leu Thr Thr Gly Met Cys Asp Arg Pro Leu Val Val Val Leu	
20 25 30	
Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Ala Val Ala Ala Glu Leu Ala Arg	
35 40 45	
Trp Pro Val Leu Leu Arg Leu Val Ala Arg Arg Pro Gly Val Val Pro	
50 55 60	
Pro Gly Gly Ala Ala Glu Thr Glu Thr Arg Thr Ala Asp Leu Thr Ala	
65 70 75 80	
Ala Ser Glu Val Ala Leu Ala Val Thr Asp Ala Asp Val Val Ile His	

	85	90	95
Leu Val Ala Arg Leu Thr Gln Gly Ala Ala Trp Arg Ala Ala Glu Ser			
100	105	110	
Asp Pro Val Ala Glu Arg Val Asn Val Gly Val Met His Asp Val Val			
115	120	125	
Ala Ala Leu Arg Ser Gly Arg Arg Ala Gly Pro Pro Pro Val Val Val			
130	135	140	
Phe Ala Gly Ser Val Tyr Gln Val Gly Arg Pro Gly Arg Val Asp Gly			
145	150	155	160
Ser Glu Pro Asp Glu Pro Val Thr Ala Tyr Ala Arg Gln Lys Leu Asp			
165	170	175	
Ala Glu Arg Thr Leu Lys Ser Ala Thr Val Glu Gly Val Leu Arg Gly			
180	185	190	
Ile Ser Leu Arg Leu Pro Thr Val Tyr Gly Ala Gly Pro Gly Pro Gln			
195	200	205	
Gly Asn Gly Val Val Gln Ala Met Val Leu Arg Ala Leu Ala Asp Glu			
210	215	220	
Ala Leu Thr Val Trp Asn Gly Ser Val Val Glu Arg Asp Leu Val His			
225	230	235	240
Val Glu Asp Val Ala Gln Ala Phe Val Ser Cys Leu Ala His Ala Asp			
245	250	255	
Ala Leu Ala Gly Arg His Trp Leu Leu Gly Ser Gly Arg Pro Val Thr			
260	265	270	
Val Pro His Leu Phe Gly Ala Ile Ala Ala Gly Val Ser Ala Arg Thr			
275	280	285	
Gly Arg Pro Ala Val Pro Val Thr Ala Val Asp Pro Pro Ala Met Ala			
290	295	300	
Thr Ala Ala Asp Phe His Gly Thr Val Val Asp Ser Ser Ala Phe Arg			
305	310	315	320
Ala Val Thr Gly Trp Arg Pro Arg Leu Ser Leu Gln Glu Gly Leu Asp			
325	330	335	
His Met Val Ala Ala Tyr Val			
340			

<210>26

<211>918

<212>DNA

<213> 橄榄色链霉菌

<220>

<221>CDS

<222>(28).. (912)

<400>26

```

ggatccagcgc aaggaggcag cggeccc atg aga tgg ctg atc acc ggc gcc gcc      54
                               Met Arg Trp Leu Ile Thr Gly Ala Ala
                               1           5

gga atg ctg ggc cgg gaa ctc gtc cgg cgc ctc gcc gag aac gag gag      102
Gly Met Leu Gly Arg Glu Leu Val Arg Arg Leu Ala Glu Asn Glu Glu
10           15           20           25

gac gtc gcg gct ctc ggc cac gac cac ctc gac gtc acc cgt ccc tcc      150
Asp Val Ala Ala Leu Gly His Asp His Leu Asp Val Thr Arg Pro Ser
           30           35           40

gcc gtg cgg gcg gca ctc gcc gag cac cgt ccc ggg atc gtc gtc aac      198
Ala Val Arg Ala Ala Leu Ala Glu His Arg Pro Gly Ile Val Val Asn
           45           50           55

tgc gcc gcc tac acg gcc gtc gac gac gcc gag acg gac gag gcc gcc      246
Cys Ala Ala Tyr Thr Ala Val Asp Asp Ala Glu Thr Asp Glu Ala Ala
           60           65           70

gct gcc ctc ctc aac gcc gag gcg ccc cgg ctg ctg gcc gag gcc tgc      294
Ala Ala Leu Leu Asn Ala Glu Ala Pro Arg Leu Leu Ala Glu Ala Cys
           75           80           85

gcc ccc cac ggc gca cgc ctc gtc cac ctg tcc acc gac tac gtc ttt      342
Ala Pro His Gly Ala Arg Leu Val His Leu Ser Thr Asp Tyr Val Phe
90           95           100           105

ccc ggc gac gcc cgc acc ccc tac gcc gag gac cac ccc acg gct ccc      390
Pro Gly Asp Ala Arg Thr Pro Tyr Ala Glu Asp His Pro Thr Ala Pro
           110           115           120

cgc agc gcc tac gga cgc acc aaa cgg gac ggc gag caa gcg gtg ctg      438
Arg Ser Ala Tyr Gly Arg Thr Lys Arg Asp Gly Glu Gln Ala Val Leu
           125           130           135

acg gca ctg ccc acc gcc acc gtg ctg cgc acc gcc tgg ctg tac ggg      486
Thr Ala Leu Pro Thr Ala Thr Val Leu Arg Thr Ala Trp Leu Tyr Gly
           140           145           150

cgc acc ggc cgc agc ttc gtc cgc acg atg atc gaa cgg gag gcg cgc      534
Arg Thr Gly Arg Ser Phe Val Arg Thr Met Ile Glu Arg Glu Ala Arg
           155           160           165

ggc ggc gcc atc gac gtc gtc gcc gac cag cgc ggc cag ccc acc tgg      582

```

Met	Arg	Trp	Leu	Ile	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Met	Leu	Gly	Arg	Glu	Leu
1				5					10					15	
Val	Arg	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Ala	Leu	Gly	His
			20					25					30		
Asp	His	Leu	Asp	Val	Thr	Arg	Pro	Ser	Ala	Val	Arg	Ala	Ala	Leu	Ala
		35					40					45			
Glu	His	Arg	Pro	Gly	Ile	Val	Val	Asn	Cys	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Val
	50					55					60				
Asp	Asp	Ala	Glu	Thr	Asp	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Asn	Ala	Glu

65	70	75	80
Ala Pro Arg Leu Leu Ala Glu Ala Cys Ala Pro His Gly Ala Arg Leu			
	85	90	95
Val His Leu Ser Thr Asp Tyr Val Phe Pro Gly Asp Ala Arg Thr Pro			
	100	105	110
Tyr Ala Glu Asp His Pro Thr Ala Pro Arg Ser Ala Tyr Gly Arg Thr			
	115	120	125
Lys Arg Asp Gly Glu Gln Ala Val Leu Thr Ala Leu Pro Thr Ala Thr			
	130	135	140
Val Leu Arg Thr Ala Trp Leu Tyr Gly Arg Thr Gly Arg Ser Phe Val			
145	150	155	160
Arg Thr Met Ile Glu Arg Glu Ala Arg Gly Gly Ala Ile Asp Val Val			
	165	170	175
Ala Asp Gln Arg Gly Gln Pro Thr Trp Thr Gly Asp Leu Ala Asp Arg			
	180	185	190
Ile Val Ala Val Gly Arg Leu Pro Gly Val His Gly Ile Leu His Ala			
	195	200	205
Thr Asn Ala Gly Ser Ala Thr Trp Tyr Asp Leu Ala Gln Glu Val Phe			
	210	215	220
Arg Leu Leu Gly Ala Asp Pro Gly Arg Val Arg Pro Thr Thr Gly Ala			
225	230	235	240
Ala Phe Arg Arg Pro Ala Pro Arg Pro Ala Tyr Ser Val Leu Gly His			
	245	250	255
Asp Arg Trp Arg Gly Thr Gly Leu Val Pro Leu Arg Asp Trp Arg Ser			
	260	265	270
Ala Leu Arg Glu Ala Phe Pro Asp Ile Leu Ala Ala Glu His Pro Pro			
	275	280	285
Thr Arg Arg Gly Ala Ala			
290			

<210>28

<211>1008

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成的 DNA

<400>28

ggatccagcg aaggaggtgc tgagatgaag ctgatacccg tgctcgggtgc gtcgggcttc	60
atcggtctgg ctgtcacgcg tgcactggcg cagcagccaa tccggctgcg agcgggtggcg	120
cgcaggcagt tcacgcccgc gcccgccaa gccgagacga ccgtcgtcgc cgctgatctc	180
accgaccgtg tcgcgtcgc cgacgcggtc gcgggacgg acgcggtcgt gtacctgctt	240
ctgtcagacg gcggatggcg cgcggtcgag accgaggacg ccgaacgcgt gaacgtgggc	300
gtcatgcggg acctcatega cgtaaccggc agcgacaacg ggacgcccc ggtagtggtg	360
ttcggcggtta ccgtctcgca ggtaggtgtg ccacctcggg agccgctcga cggcagcgag	420
cccacaacc cggcgactcc ctacgacata cagaagctga cagcggaaca gatactcaag	480
aaggccacgg caaatggcca ggtgcgcggc atcagcctgc gtctgccgac gatattcggt	540
gaaaccacgg cacaaggcgc gaaccacgac cgcgggtgtcg tgctgtccat ggcgcggcga	600
gcgctcgacg gccaggcact caccatctgg ggcgacggca gcgtgcgacg cgacgtcgtc	660
catgtcgagg acgtcgcggc ggcgttcacc gcggcactgg ccaacccgga ttcccttgtc	720
ggcgccact ggctgacgg cgcgggccga ggcatcagc ttggggagat tttccgcctc	780
gtggcacggg aagtggccga gcagaccggg cagcgcccgg tcgaggtgac ctgtgtggaa	840
ccaccgtcgc acgcacctga gatggatttc cgcagcgtca ccatcgattc ctcgccgttc	900
cgggcggtca ccggctggcg ccagagatt tcgtgtccg aaggagtgcg tcgcactgtc	960
gccgattga cgacatcagt tcatggaaag gctcgcgcat gatctaga	1008